

507,521

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
2 octobre 2003 (02.10.2003)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 03/080209 A2

(51) Classification internationale des brevets⁷ : **B01D**

BERTHIER, Jean [FR/FR]; 8 rue des Florentines,
F-38240 MEYLAN (FR). **DAVOUST, Laurent** [FR/FR];
40 rue Claude Genin, F-38100 GRENOBLE (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :

PCT/FR03/00920

(22) Date de dépôt international : 24 mars 2003 (24.03.2003)

(74) Mandataire : **GUERRE, Fabien**; c/o BREVATOME, 3,
rue du Docteur Lancereaux, F-75008 PARIS (FR).

(25) Langue de dépôt : français

(81) États désignés (national) : JP, US.

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
02/3690 25 mars 2002 (25.03.2002) FR

(84) États désignés (régional) : brevet européen (AT, BE, BG,
CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE,
IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR).

(71) Déposants (pour tous les États désignés sauf US) : **COM-
MISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE** [FR/FR];
31/33, rue de la Fédération, F-75752 PARIS 15ème (FR).
**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTI-
FIQUE** [FR/FR]; 3 rue Michel Ange, F-75794 PARIS
CEDEX 16 (FR).

Publiée :

— sans rapport de recherche internationale, sera republiée
dès réception de ce rapport

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrévia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) :

(54) Title: METHOD OF CONCENTRATING MACROMOLECULES OR AGGLOMERATES OF MOLECULES OR PARTICLES

(54) Titre : PROCEDE DE CONCENTRATION DE MACROMOLECULES OU AGGLOMERATS DE MOLECULES OU DE PARTICULES

(57) Abstract: The invention relates to a method for the selective concentration of a macromolecule or an agglomerate of molecules or particles contained in a liquid sample. The inventive method comprises the following steps, namely: the formation of a foam -or emulsion-type stabilised dispersion from a medium comprising the aforementioned liquid sample and an interfacial layer, whereby said interfacial layer can selectively fix the macromolecule or the agglomerate to be concentrated; and the resorption of the dispersion formed during the preceding step so as to reform said interfacial layer. The invention can be used to concentrate DNA, proteins, prions, colloidal particles.

(57) Abrégé : La présente invention a pour objet un procédé de concentration sélective d'une macromolécule ou d'un agglomérat de molécules ou particules contenu dans un échantillon liquide, comprenant successivement les étapes suivantes: - formation d'une dispersion stabilisée de type mousse ou émulsion, à partir d'un milieu comprenant ledit échantillon liquide et une couche interfaciale, ladite couche interfaciale étant apte à fixer sélectivement ladite macromolécule ou ledit agglomérat à concentrer ; et- résorption de la dispersion formée lors de l'étape précédente de façon à reformer ladite couche interfaciale. Application à la concentration d'ADN, de protéines, de prions, de particules colloïdales.

WO 03/080209 A2

PROCEDE DE CONCENTRATION DE MACROMOLECULES OU
AGGLOMERATS DE MOLECULES OU DE PARTICULES
DESCRIPTION

DOMAINE TECHNIQUE

5 La présente invention a trait à un procédé de concentration de macromolécules ou d'agglomérats de molécules ou de particules, en vue d'une éventuelle détection ou d'une extraction spécifique desdites macromolécules ou desdits agglomérats.

10 **ETAT DE LA TECHNIQUE ANTERIEURE**

 Actuellement, les techniques de concentration de macromolécules ou d'agglomérats de molécules sont, pour la plupart, destinées au domaine du diagnostic médical, notamment au domaine de la
15 déttection de brins d'ADN ou de complexes protéiniques tels que les antigènes ou les prions.

 Pour la détection de brins d'ADN, la technique actuelle consiste, le plus souvent, à concentrer des brins d'ADN par amplification dans un
20 milieu liquide, selon la technique communément désignée par l'abréviation PCR (« Polymerase Chain Reaction » ou « Réaction en Chaîne par Polymérase »).

 Cette technique consiste à répliquer les brins d'ADN contenus dans un échantillon liquide un
25 grand nombre de fois (jusqu'à 10^5 - 10^6 fois) en injectant de la polymérase dans l'échantillon soumis à une série de cycles thermiques.

 Après un nombre de cycles thermiques assez
30 important, en tout cas supérieur à 10, la concentration

en ADN est suffisamment importante pour permettre la détection.

Toutefois, cette technique, telle qu'explicitée ci-dessus, nécessite une durée importante, du fait du nombre conséquent de cycles thermiques à reproduire pour avoir une quantité d'ADN suffisante. De plus, cette technique s'accompagne d'un bruit de fond important du fait que la polymérase peut amplifier des segments d'ADN présents dans l'échantillon liquide, qui sont de nature différente des segments d'ADN à détecter.

Afin de pallier ces inconvénients, des méthodes alternatives à la PCR ont été développées. Parmi ces méthodes, on peut citer une méthode ne nécessitant pas d'amplification. Le principe de cette méthode de détection sans amplification repose sur la capture des segments d'ADN cibles aussi peu nombreux soient-ils. Elle consiste à hybrider les segments d'ADN cibles avec des nanobilles paramagnétiques fonctionnalisées de manière à concentrer lesdits segments à la surface de ces billes avant détection. Cette méthode se heurte toutefois au problème de l'adsorption non spécifique, certaines billes paramagnétiques, enrobées de latex, se collant aux parois solides du réacteur, au niveau duquel est mise en œuvre la méthode, sous l'effet de l'hydrophobie ou des forces électriques. La sensibilité atteinte n'est alors plus celle escomptée.

En ce qui concerne la détection de protéines telles que les anticorps ou les antigènes, deux types de tests se distinguent : les tests dits

« en phase homogène » et ceux en « phase hétérogène ».
Les tests en phase homogène ont lieu en solution. La
mesure de la quantité d'anticorps est réalisée
directement dans la solution par fixation de cet
5 anticorps sur l'antigène complémentaire, sans qu'il y
ait de séparation physique entre les anticorps libres
et les anticorps liés à un antigène. Cette distinction
entre anticorps libre et anticorps lié est faite grâce
à diverses astuces, notamment basées, par exemple, sur
10 un transfert de fluorescence entre deux anticorps
(l'antigène étant pris en sandwich entre deux anticorps
marqués par exemple). Ces tests présentent l'avantage
d'être rapides, et peu coûteux. Ce sont eux qui sont
massivement utilisés dans les programmes de criblage
15 haut débit de l'industrie pharmaceutique par exemple.
Toutefois, leur sensibilité est limitée, aux environs
de 1nM en ce qui concerne les tests basés sur les
acides nucléiques. C'est pourquoi l'industrie du
diagnostic utilise préférentiellement des tests en
20 phase hétérogène, dans lesquels un anticorps est
immobilisé sur un support solide, support qu'il sera
alors possible de laver pour éliminer la quasi-totalité
des réactifs de marquage. De plus, une amplification du
signal est réalisée, en utilisant une enzyme comme
25 molécule de marquage. Ces tests sur support solide sont
plus lents et plus onéreux que ceux en phase homogène,
mais ils permettent d'atteindre des sensibilités bien
plus grandes, aux alentours de $0,1\text{ pM}$, soit 10 000 fois
mieux que les tests en phase homogène. Toutefois,
30 l'utilisation d'un support solide rend ces tests
difficiles à mettre en œuvre.

En ce qui concerne les complexes protéiniques tels que les prions, ceux-ci doivent également, pour être détectables, dans des liquides physiologiques, tels que le sang, subir une phase de concentration. Pour ces molécules, la technique PCR précédemment décrite est inutilisable, parce qu'ils ne contiennent pas de nucléotides. De ce fait, des recherches relatives au domaine des prions ont abouti récemment à la mise en place d'une méthode dite 'méthode d'amplification des protéines anormalement repliées' ou PMCA (pour 'Protein Misfolding Cyclic Amplification').

Les prions, responsables notamment des encéphalopathies spongiformes, sont des complexes ou agglomérats constitués d'une protéine naturelle, la glycoprotéine PrP^{C} , normalement présente à la surface de nombreuses cellules dans l'organisme et d'une protéine infectieuse PrP^{Sc} , qui ne se différencie de la glycoprotéine normale PrP^{C} que par sa conformation, qui est anormalement repliée. Les protéines PrP^{Sc} sont aptes, d'une part, à s'associer aux protéines PrP^{C} et d'autre part, aptes à induire la transformation de protéines normales en protéines infectieuses. La détection des prions est rendue difficile par le fait qu'ils ne sont présents en quantité notable que dans le cerveau, alors qu'ils se retrouvent à l'état de traces dans le sang.

La technique PMCA permet ainsi de concentrer les prions dans le milieu de prélèvement, c'est-à-dire le sang, afin qu'ils puissent être détectés.

Pour ce faire, un procédé de sonication destiné à fragmenter les prions est mis en œuvre. Tous les prions issus de cette fragmentation par ultra-sons, repoussent in-vitro à l'aide des protéines PrP^C de l'échantillon. Ce cycle élémentaire (fragmentation-repousse) est reproduit autant de fois que nécessaire, jusqu'à ce que la quantité de prions devienne détectable.

L'étape de détection, facilitée par l'étape d'amplification, est effectuée par spectroscopie de fluorescence. Les protéines à détecter sont marquées à l'aide d'une sonde fluorescente, dont la présence se manifeste lorsque celle-ci est éclairée par une lumière de longueur d'onde caractéristique. Toutefois, cette technique engendre, le plus souvent, un bruit de fond non négligeable, du fait que les sondes peuvent s'associer à d'autres molécules que les prions à détecter.

Une technique plus élaborée, dite technique de corrélation de fluorescence, met en œuvre deux sondes fluorescentes qui émettent selon deux longueurs d'onde différentes et qui s'accrochent toutes deux symétriquement et spécifiquement sur les protéines PrP^C, ces dernières se trouvant en concentration importante au sein des prions. On éclaire ensuite avec des faisceaux à deux longueurs d'onde différentes, un volume très petit du liquide contenant les prions à détecter et on détecte, de manière instationnaire, les deux émissions fluorescentes intenses dues à la présence de prions, qui constituent un agglomérat de protéines PrP normales ou infectieuses sur lesquelles

sont accrochées les sondes fluorescentes. Toutefois, un bruit de fond subsiste, dû notamment à la présence de sondes fluorescentes n'ayant pu trouver de sites d'adsorption spécifiques et à la présence de protéines normales PrP^c isolées, auxquelles se sont accrochées des sondes fluorescentes.

Ainsi, les procédés de concentration, exposés précédemment, présentent tous l'un ou plusieurs des inconvénients suivants :

-ils ne permettent pas une concentration spécifique des macromolécules ou agglomérats à concentrer, du fait que certaines de ces techniques peuvent générer des espèces, pouvant entraîner, notamment lors d'une éventuelle détection, un bruit de fond important ;

-ils ne permettent pas une concentration suffisante des macromolécules ou agglomérats en vue d'une éventuelle détection.

20

EXPOSE DE L'INVENTION.

La présente invention a précisément pour objet de proposer un procédé de concentration de macrolécules ou d'agglomérats de molécules ou de particules, qui permette notamment une concentration sélective desdites macromolécules ou desdits agglomérats, en vue d'une éventuelle détection en limitant autant que possible les bruits de fond, ou en vue d'une éventuelle purification d'un échantillon

contenant lesdites macromolécules ou lesdits agglomérats.

Pour ce faire, la présente invention a pour
5 objet un procédé de concentration sélective d'une macromolécule ou d'un agglomérat de molécules ou de particules contenu dans un échantillon liquide, comprenant successivement les étapes suivantes :

- formation d'une dispersion stabilisée de
10 type mousse ou émulsion, à partir d'un milieu comprenant ledit échantillon liquide et une couche interfaciale, ladite couche interfaciale étant apte à fixer sélectivement ladite macromolécule ou ledit agglomérat à concentrer ; et

15 - résorption de la dispersion formée lors de l'étape précédente de façon à reformer ladite couche interfaciale.

Par couche interfaciale, on entend, selon l'invention, une monocouche (ou zone quasi-
20 bidimensionnelle) localisée à la surface de l'échantillon liquide (dite première phase liquide) comprenant la macromolécule ou l'agglomérat à concentrer. De part sa nature et ses propriétés spécifiques, cette couche est apte à assurer le
25 transfert sélectif de la macromolécule ou de l'agglomérat de l'échantillon liquide vers la couche interfaciale, et, du fait de son volume infime par rapport à l'échantillon liquide, à concentrer ladite macromolécule ou ledit agglomérat.

30 Selon la nature de la macromolécule ou de l'agglomérat à concentrer, la couche interfaciale peut

correspondre à une deuxième phase liquide déposée à la surface de l'échantillon liquide (cas par exemple, lorsqu'il s'agit de concentrer une macromolécule du type ADN), cette phase présentant des caractéristiques
5 telles qu'elle permet d'attirer la macromolécule ou l'agglomérat vers elle. La couche interfaciale peut correspondre également à l'interface entre l'atmosphère ambiante et l'échantillon liquide (par exemple, lorsque la macromolécule ou l'agglomérat à concentrer présente
10 un caractère hydrophobe, tel que les prions, et que l'échantillon liquide le contenant est un milieu aqueux).

Dans le cas où la couche interfaciale correspond à une deuxième phase liquide, le procédé de
15 l'invention peut comprendre une étape préalable (située avant l'étape de formation de la dispersion) consistant à déposer à la surface de l'échantillon liquide ladite deuxième phase liquide ou couche interfaciale.

Généralement, l'étape de formation de la dispersion est effectuée par agitation mécanique du milieu comprenant l'échantillon liquide et la couche
20 interfaciale ou par injection directement dans l'échantillon liquide surmontée de la couche
25 interfaciale de jets capillaires gazeux ou liquides.

On note qu'une mousse désigne une dispersion comprenant un ensemble de bulles de gaz (typiquement d'air) coexistant avec un milieu liquide interstitiel, sous forme de minces films interstitiels
30 entre les bulles. Ce type de dispersion ménage ainsi une multitude d'interfaces liquide-gaz. La mousse,

selon l'invention, peut être obtenue, par exemple, par agitation mécanique vigoureuse du milieu susmentionné ou par injection au sein de ce milieu de jets capillaires gazeux (typiquement des jets d'air).

5 On note que, selon l'invention, une émulsion désigne une dispersion, dans laquelle la couche interfaciale est divisée en globules au sein de l'échantillon liquide, ledit échantillon liquide constituant un milieu interstitiel. On forme ainsi une
10 multitude d'interfaces liquide-liquide, et on augmente de ce fait considérablement la surface de contact entre l'échantillon liquide et la couche interfaciale.

 L'émulsion, au même titre que la mousse, peut être obtenue par agitation mécanique du milieu
15 comprenant l'échantillon liquide et la couche interfaciale mais également par injection directe dans l'échantillon liquide surmonté de la couche interfaciale de jets capillaires liquides ou gazeux.

 Ainsi, selon l'invention, le fait de passer
20 par une dispersion du type mousse ou émulsion pour assurer la concentration d'une macromolécule ou d'un agglomérat de molécules ou particules contribue à ménager une multitude de zones interstitielles entre l'échantillon liquide et la couche interfaciale, ce qui
25 augmente considérablement la quantité de surface entre ces deux milieux et facilite, de ce fait, la fixation des macromolécules ou les agglomérats de molécules par la couche interfaciale dispersée. Cette
30 fixation se fait dans des zones quasi-bidimensionnelles, du fait qu'elle a lieu au niveau des zones interstitielles, ce qui améliore grandement

l'efficacité et le temps de capture des macromolécules à concentrer par la couche interfaciale.

Si la structure de la couche interfaciale fonctionnalisée est potentiellement instable sous l'effet de la création d'aire interfaciale, on pourra
5 mettre à profit l'instabilité de Rayleigh pour réaliser une émulsion dans des conditions quasi-statiques ; le liquide le plus dense se trouvant au-dessus du liquide le moins dense dans les conditions initiales.

Après résorption de la dispersion, on se retrouve, ainsi, en présence d'une couche interfaciale reformée concentrée en macrolécules ou agglomérats de
10 molécules et d'une phase liquide correspondant à l'échantillon liquide dépourvu en tout ou partie desdites macromolécules ou desdits agglomérats.

L'avantage de la présente invention est donc de pouvoir concentrer rapidement et sans amplification, les macromolécules ou agglomérats et ceci de manière sélective, en passant par la formation
20 d'une dispersion qui augmente l'efficacité de la concentration.

Comme décrit précédemment, après capture des macromolécules ou agglomérat de molécules ou
25 particules à concentrer, la dispersion est amenée à subir une étape de résorption. Cette étape peut être menée de différentes manières. Par exemple, cette étape de résorption de la dispersion peut être effectuée par drainage des films interstitiels, dans le cas d'une mousse, ou du milieu interstitiel, dans le cas d'une
30 émulsion. La cinétique de la résorption peut être

contrôlée soit par un choix judicieux, le cas échéant, des molécules constitutives de la couche interfaciale des macromolécules ou agglomérats via la longueur des chaînes moléculaires, par exemple, à l'aide d'un
5 cisaillement mécanique de la dispersion.

Selon la nature de la couche interfaciale et de la macromolécule ou de l'agglomérat à concentrer, et notamment lorsque la couche interfaciale correspond à une deuxième phase liquide, la couche interfaciale
10 peut comprendre au moins une molécule apte à fixer sélectivement les macromolécules ou les agglomérats de molécules ou particules en question.

Selon ce mode de réalisation, la molécule apte à fixer la macromolécule ou agglomérat de
15 molécules ou particules à concentrer est contenue dès le départ dans la couche interfaciale avant formation de la mousse ou de l'émulsion ; elle peut être une molécule comportant des groupements aptes à fixer la macromolécule ou ledit agglomérat par affinité
20 chimique, polarisation électrique ou magnétique, et/ou ionisation, ladite molécule pouvant être, de préférence, une molécule surfactante.

Si ladite molécule n'est pas mélangée avec d'autres molécules surfactantes, ladite molécule peut
25 être également, du fait de propriétés surfactantes, une molécule stabilisatrice de la dispersion formée au cours d'une des étapes du procédé.

Dans ce cas, la molécule assure une double fonction, qui est de fixer la macromolécule ou
30 l'agglomérat à concentrer et également d'assurer la stabilisation de la dispersion, contribuant ainsi à

augmenter le temps de contact au niveau des zones interstitielles entre molécules attractives et macromolécules ou agglomérats à concentrer.

5 Le procédé selon l'invention peut s'appliquer à la concentration de tout type de macromolécules ou d'agglomérats.

 A titre d'exemples, on peut citer comme macromolécules pouvant être concentrées, selon le
10 procédé de l'invention, les acides nucléiques, les protéines telles les anticorps ou les antigènes.

 A titre d'exemples, on peut citer comme agglomérats de molécules pouvant être concentrés, selon le procédé de l'invention, les prions.

15 A titre d'exemples, on peut citer comme agglomérats de particules pouvant être concentrés des particules colloïdales telles que des particules d'or.

 Ainsi, le procédé selon l'invention peut être mis en œuvre pour la concentration d'un acide
20 nucléique particulier, qui est l'ADN.

 Dans le cas de l'ADN, la couche interfaciale correspond à une deuxième phase liquide comprenant une molécule apte à fixer l'ADN, qui est, par exemple, une molécule fonctionnalisée par une sonde
25 (telle qu'un ADN complémentaire de l'ADN à concentrer) de façon à permettre l'hybridation spécifique de l'ADN à concentrer, par exemple, un lipide fonctionnalisé par un ADN complémentaire de l'ADN à concentrer.

 Le fait que la molécule soit un lipide est
30 particulièrement intéressant dans le cadre de cette invention, car cette catégorie de molécules contribue à

assurer la stabilisation de la dispersion formée. De plus, la fonctionnalisation de cette molécule par un ADN complémentaire de l'ADN à concentrer permet une concentration et une extraction sélective dudit ADN.

5 A titre d'exemples, on peut citer, comme lipides fonctionnalisés efficaces dans la concentration d'ADN, des lipides biotinylés comportant un groupement avidine ou dérivé de l'avidine, sur lequel est greffé l'ADN complémentaire par une extrémité biotinylée
10 précédemment incorporée audit ADN complémentaire ou encore des lipides cationiques comprenant au moins un groupement spermine sur lequel est adsorbé l'ADN complémentaire. De tels lipides cationiques peuvent être des lipides du type DOGS ou
15 Dioctadécylamidoglycylspermine, commercialisé sous la marque Transfectam™. Ces lipides présentent deux chaînes carbonées saturées en C₁₈ ainsi qu'une tête polaire constituée d'un groupement spermine présentant une forte affinité pour l'ADN. L'ADN complémentaire est
20 ainsi adsorbé sur les sites spermine. Les lipides résultant constituent de véritables sondes fonctionnalisées permettant l'hybridation spécifique des ADN à concentrer, dit 'ADN cibles'.

Le procédé selon l'invention peut être
25 utilisé pour la concentration sélective d'antigènes ou d'anticorps contenus dans un échantillon liquide, sans passer par un support solide, tel que cela est le cas des réalisations de l'art antérieur. Selon ce mode de réalisation, la couche interfaciale correspond à une
30 deuxième phase liquide déposée à la surface de l'échantillon liquide et comprend des vésicules ou

liposomes constitués de phospholipides et contenant l'anticorps ou l'antigène complémentaire de l'antigène ou l'anticorps à concentrer.

Le procédé selon l'invention peut également
5 être utilisé pour la concentration d'agglomérats de molécules, tels que les prions. Dans le cas des prions, la couche interfaciale correspond à l'interface (échantillon liquide/atmosphère ambiante), la couche interfaciale étant apte à concentrer sélectivement les
10 prions, du fait du caractère hydrophobe des prions (l'échantillon liquide étant un milieu aqueux tel que le sang).

Le procédé selon l'invention peut également être utilisé pour la concentration de particules
15 colloïdales. Celles-ci peuvent être, par exemple, des particules submicroniques d'or solubilisées dans l'eau (correspondant selon la terminologie de l'invention à la première phase liquide). Dans ce cas, la couche interfaciale correspond à une deuxième phase liquide
20 comprenant des molécules aptes à fixer ces particules colloïdales d'or, lesdites molécules étant, par exemple, des molécules portant des groupements thiol - SH.

Le procédé de concentration, explicité ci-dessus, sert, comme son nom l'indique, à concentrer
25 sélectivement dans une couche interfaciale une macromolécule ou un agglomérat de macromolécules donné. Il peut, de ce fait, être mis en œuvre, afin de purifier, de détecter ou d'amplifier la macromolécule
30 ou un agglomérat de molécules ou particules donné.

Ainsi, la présente invention a également pour objet un procédé de purification d'une macromolécule ou d'un agglomérat de molécules ou particules contenu initialement dans un échantillon
5 liquide, comprenant la concentration de ladite macromolécule ou dudit agglomérat au sein de ladite couche interfaciale par la mise en oeuvre du procédé de concentration décrit précédemment suivie de l'élimination de l'échantillon liquide appauvri en
10 ladite macromolécule ou ledit agglomérat, après l'étape de concentration.

Par exemple, ce procédé trouve son application dans le cas de la purification d'ADN. Dans ce cas, le procédé selon l'invention consiste à partir
15 de molécules fonctionnalisées par un ADN complémentaire spécifique, à extraire spécifiquement un ADN cible, à partir d'un échantillon liquide comprenant, par exemple, un mélange de divers ADN ou diverses portions d'ADN, ledit échantillon étant ensuite éliminé.

20 Ce procédé peut également trouver son application dans la purification de protéines. La capture sélective de protéines via la couche de lipides fonctionnalisés, suivi d'une étape ultérieure de cristallisation desdites protéines peut permettre
25 d'isoler ces protéines afin d'en étudier leur structure ou bien permettre de purifier une solution de la protéine en question.

La présente invention a également pour
30 objet un procédé de détection d'une macromolécule ou d'un agglomérat de molécules ou particules contenu

initialement dans un échantillon liquide comprenant la concentration au sein d'une couche interfaciale de ladite macromolécule ou dudit agglomérat par la mise en oeuvre du procédé de concentration décrit précédemment suivie de la détection de ladite macromolécule ou dudit agglomérat au sein de ladite couche par des techniques appropriées de détection.

Ainsi, lorsque la macromolécule est de l'ADN, la détection de l'ADN, après concentration sélective, peut se faire par fluorescence excitée par laser ou en détectant la variation du potentiel électrique de surface au niveau de la couche fonctionnalisée, ou encore par une technique de rhéologie interfaciale. Les performances de la détection par fluorescence ou électrique peuvent être notamment améliorées en comprimant par un procédé mécanique ou hydrodynamique la couche interfaciale contenant les ADN cibles hybridés en un point de l'interface (au centre, par exemple) coïncidant avec le volume laser d'excitation ou bien avec la présence d'une sonde électrique.

Enfin, la présente invention a également pour objet un procédé d'amplification d'une macromolécule ou d'un agglomérat de molécules ou particules contenu initialement dans un échantillon liquide comprenant la concentration de ladite macromolécule ou dudit agglomérat au sein d'une couche interfaciale par la mise en oeuvre du procédé de concentration décrit précédemment, le remplacement dudit échantillon liquide, après l'étape de

concentration de ladite macromolécule ou dudit agglomérat au sein de ladite couche, par un liquide comprenant des agents d'amplification, suivie de l'étape d'amplification au moyen desdits agents.

5 Ainsi, lorsque le procédé d'amplification s'applique à l'ADN, après concentration des segments d'ADN cibles dans la couche interfaciale, l'échantillon liquide appauvri en ces segments est soutiré et remplacé par un liquide purifié contenant des agents
10 d'amplification tels que la polymérase et des désoxyribonucléotides. La phase d'amplification par PCR peut être alors réalisée sans la présence de segments d'ADN parasites et le bruit de fond de la PCR s'en trouve considérablement réduit.

15 Par exemple, lorsque le procédé d'amplification s'applique à des agglomérats de molécules tels que les prions, après concentration des prions dans une couche interfaciale donnée, selon le
20 procédé de concentration décrit précédemment, l'échantillon liquide appauvrie en lesdits prions peut être soutirée et remplacée par un liquide pur contenant des agents d'amplification tels que des protéines normales PrP^C non encore transformées. Ensuite, les
25 étapes classiques de la PMCA (sonication, ...) peuvent être mises en œuvre sans être gênées par des molécules parasites.

 Ce procédé d'amplification peut être suivi d'une détection ultra-sensible, par exemple, par
30 corrélation de fluorescence, effectuée conjointement ou non à la PMCA. Par cette technique, on peut améliorer

les performances de la détection en concentrant, à l'aide d'un procédé mécanique ou hydrodynamique, les prions localement en un point de la couche interfaciale qui coïncide avec le volume de mesure laser ou bien
5 avec la présence d'une sonde électrique.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront mieux à la lecture de la description du mode de réalisation particulier qui suit, en référence aux dessins annexés.

10

BREVE DESCRIPTION DES FIGURES.

La figure 1 représente les différentes étapes, pour arriver à la concentration d'un ADN cible, selon un mode particulier de réalisation du procédé de
15 concentration selon l'invention.

La figure 2 représente une vue détaillée d'un film interstitiel créé lors de la formation d'une mousse.

Les figures 3, 4 et 5 représentent des
20 procédés de purification, de détection et de concentration mises en œuvre après le procédé de concentration explicité sur la figure 1.

EXPOSE D'UN MODE PARTICULIER DE REALISATION DE 25 L'INVENTION.

La figure 1 représente, à titre illustratif et non limitatif, la mise en œuvre, en quatre étapes (a), (b), (c) et (d), du procédé selon l'invention pour la concentration d'un ADN cible.

30

L'étape (a) de la figure 1 représente un microbêcher 10, dans lequel est déposé, à l'aide d'une

micropipette ou d'une seringue, un échantillon liquide 12 contenant l'ADN cible 14, représenté sur la figure sous forme de brins. Ledit échantillon 12 est surmonté de l'atmosphère ambiante 11.

5 Au cours de l'étape intitulée (b) sur la figure 1, une monocouche 16 comprenant un mélange de lipides ligands 18 et de lipides diluants 17 (rapport lipides ligands/lipides diluants 1 :4) est déposée à la surface de l'échantillon liquide 12. Cette monocouche
10 16 correspond, selon la terminologie de l'invention, à une couche interfaciale. Ces lipides ligands 18 sont tels que les ADN cibles vont pouvoir s'hybrider avec lesdits lipides. Pour cela, ces lipides doivent, au cours d'une étape préliminaire, être fonctionnalisés.
15 Ainsi, les lipides ligands peuvent être des lipides initialement biotinylés, du type biotine-(LC)-DPPE, sur lesquels on adsorbe dans un premier temps de l'avidine puis dans un deuxième temps l'on greffe l'ADN complémentaire de l'ADN cible, sur l'avidine par le
20 biais d'un groupement biotine fixé sur l'une des extrémités de l'ADN complémentaire. L'ensemble (lipide biotinylé-Avidine-ADN complémentaire biotinylé) constitue un lipide fonctionnalisé par une sonde permettant une hybridation spécifique des brins d'ADN
25 cible.

Les lipides peuvent être également des lipides cationiques comprenant au moins une extrémité spermine, sur laquelle est adsorbée un ADN complémentaire de l'ADN cible à concentrer.

Il est bien entendu que les molécules aptes à fixer de l'ADN cible peuvent s'étendre à tout type de molécules aptes à fixer sélectivement l'ADN cible.

5 Conformément à l'invention et comme l'illustre l'étape (c) de la figure 1, une dispersion 20 du type mousse est créée par injection d'air dans l'échantillon liquide, ladite mousse étant constituée d'un ensemble de bulles, maintenu en cohésion par des
10 films liquides interstitiels. La stabilité temporaire de la mousse est assurée par les lipides constitutifs de la phase sous forme de monocouche 16.

Une vue détaillée d'un film liquide interstitiel constitutif de la dispersion de type
15 mousse est représentée sur la figure 2. Sur cette figure, ce film présente une forme octaédrique 22 de très faible volume, au sein duquel coexistent l'échantillon liquide 12 et la monocouche 16 ou couche interfaciale. De ce fait, l'ADN cible 14 se trouve
20 quasiment en contact direct avec les lipides fonctionnalisés 18 de la monocouche ou couche interfaciale et se trouve ainsi très vite adsorbé par ces lipides 18. Le fait de passer par une mousse multiplie l'efficacité et la cinétique de capture de
25 l'ADN par les lipides, du fait du très faible volume des films interstitiels constitutifs de la mousse.

Enfin, au cours d'une ultime étape représentée en (d) de la figure 1, la mousse est résorbée, laissant place à nouveau à un milieu
30 biphasique non dispersé comprenant la monocouche de lipidique 24, de très faible épaisseur, au niveau de

laquelle s'est adsorbé les ADN cibles sur les lipides hybridés 19, cette monocouche correspondant à une couche interfaciale référencée 24 sur le dessin et une phase 26 correspondant à l'échantillon liquide 12 appauvri en ADN cible. Il est bien entendu, que, sur l'ensemble de la figure 1, les lipides 17, 18 et 19 ne devraient être localisés uniquement qu'au niveau de la monocouche 16 ou couche interfaciale 24 (pour la figure 1d), d'épaisseur infime. Toutefois, pour des raisons de visibilité, lesdits lipides ont été considérablement grossis.

Les figures 3, 4 et 5 illustrent différentes applications envisageables du procédé de concentration, mises en œuvre selon un mode de réalisation particulier décrit ci-dessus.

Ainsi, la figure 3 illustre le cas où, après concentration desdits ADN cibles, par le procédé explicité sur la figure 1, lesdits ADN sont détectés par des techniques de fluorescence. Dans ce cas, les lipides 19 fonctionnalisés par un ADN complémentaire de l'ADN cible et hybridés, comportent, en plus, un marqueur fluorescent. Ainsi, on peut déterminer la présence d'ADN cible au niveau de la couche interfaciale 24 par une mesure de fluorescence.

La figure 4 illustre un cas particulier de purification d'un ADN préalablement concentré, par le procédé de concentration explicité selon la figure 1. Une fois que la résorption de la mousse est achevée, la phase 26 appauvrie en ADN, ledit ADN étant adsorbé, en majeure partie sur la couche 24, est soutirée à l'aide

d'une micropipette 23 et l'on obtient une couche interfaciale 24 d'ADN purifié.

La figure 5 illustre le cas où le procédé de concentration est utilisé dans le seul but d'obtenir
5 une phase plus concentrée en un ADN donné que la phase d'origine dudit ADN. A ce moment-là, la couche 24 riche en ADN cible est soutirée à l'aide d'une micropipette 23 pour être utilisée pour des applications diverses.

Il est bien entendu, que d'autres
10 applications, non représentées sur ces figures, peuvent être envisagées.

REVENDICATIONS

1. Procédé de concentration sélective d'une macromolécule ou d'un agglomérat de molécules ou de particules contenu dans un échantillon liquide, 5 comprenant successivement les étapes suivantes :

- formation d'une dispersion stabilisée de type mousse ou émulsion, à partir d'un milieu comprenant ledit échantillon liquide et une couche interfaciale, ladite couche interfaciale étant apte à 10 fixer sélectivement ladite macromolécule ou ledit agglomérat à concentrer ; et

- résorption de la dispersion formée lors de l'étape précédente de façon à reformer ladite couche interfaciale.

15

2. Procédé de concentration selon la revendication 1, dans lequel l'étape de formation de la dispersion est effectuée par agitation mécanique du milieu comprenant ledit échantillon liquide et ladite 20 couche interfaciale.

3. Procédé de concentration selon la revendication 1, dans lequel l'étape de formation de la dispersion est effectuée par injection directement dans 25 l'échantillon liquide de jets capillaires gazeux ou liquides.

4. Procédé de concentration selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, dans lequel la 30 couche interfaciale comprend au moins une molécule apte

à fixer sélectivement ladite macromolécule ou ledit agglomérat.

5. Procédé de concentration selon la
5 revendication 4, dans lequel la molécule apte à fixer la macromolécule ou agglomérat de molécules ou de particules à concentrer est une molécule comportant des groupements aptes à fixer la macromolécule ou agglomérat par affinité chimique, polarisation
10 électrique ou magnétique, et/ou ionisation, ladite molécule étant, de préférence, une molécule surfactante.

6. Procédé de concentration selon l'une
15 quelconque des revendications 1 à 5, dans lequel la macromolécule est choisie parmi le groupe constitué par les acides nucléiques et les protéines, telles que les antigènes et les anticorps.

20 7. Procédé de concentration selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, dans lequel l'agglomérat de molécules est un prion.

8. Procédé de concentration selon l'une
25 quelconque des revendications 1 à 5, dans lequel l'agglomérat de particules est choisi parmi le groupe constitué de particules colloïdales.

9. Procédé selon l'une quelconque des
30 revendications 1 à 6, dans lequel la macromolécule à concentrer est l'ADN.

10. Procédé selon la revendication 4, dans lequel, lorsque la macromolécule à concentrer est l'ADN, la molécule apte à fixer l'ADN est fonctionnalisée par une sonde de façon à permettre
5 l'hybridation spécifique de l'ADN à concentrer.

11. Procédé selon la revendication 10, dans lequel la molécule apte à fixer l'ADN est un lipide fonctionnalisé par une sonde ADN complémentaire de
10 l'ADN à concentrer.

12. Procédé selon la revendication 11, dans lequel le lipide est un lipide biotinylé comportant un groupement avidine ou dérivé de l'avidine, sur lequel
15 est greffé l'ADN complémentaire par une extrémité biotinylée précédemment incorporée audit ADN.

13. Procédé selon la revendication 11, dans lequel le lipide est un lipide cationique comprenant au moins un groupement spermine sur lequel est adsorbé
20 l'ADN complémentaire.

14. Procédé de purification d'une macromolécule ou d'un agglomérat de molécules ou
25 particules contenu initialement dans un échantillon liquide, comprenant la concentration de ladite macromolécule ou dudit agglomérat au sein d'une couche par la mise en oeuvre du procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, l'élimination de
30 l'échantillon liquide appauvri en ladite macromolécule ou ledit agglomérat, après l'étape de concentration.

15. Procédé de détection d'une macromolécule ou d'un agglomérat de molécules ou particules contenu initialement dans un échantillon liquide comprenant la concentration au sein d'une
5 couche de ladite macromolécule ou dudit agglomérat par la mise en oeuvre du procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 13 et la détection de ladite macromolécule ou dudit agglomérat au sein de ladite couche par des techniques appropriées de détection.

10

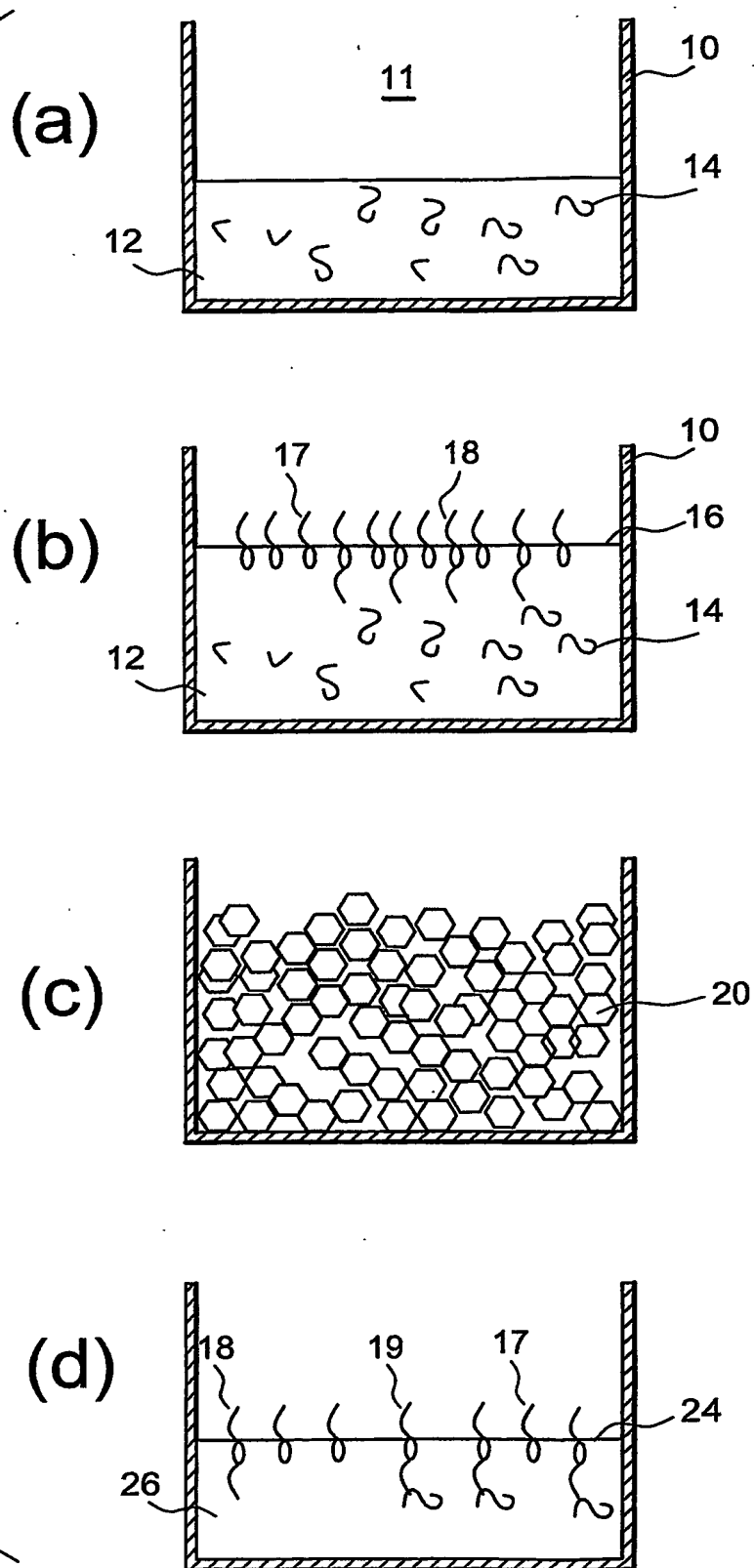
16. Procédé d'amplification d'une macromolécule ou d'un agglomérat de molécules ou particules contenu initialement dans un échantillon liquide comprenant la concentration de ladite
15 macromolécule ou dudit agglomérat au sein d'une couche par la mise en oeuvre du procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 13 et le remplacement dudit échantillon liquide, après l'étape de concentration de ladite macromolécule ou dudit agglomérat au sein de
20 ladite couche, par un liquide comprenant des agents d'amplification, suivie de l'étape d'amplification au moyen desdits agents.

17. Procédé d'amplification selon la
25 revendication 16, dans lequel la macromolécule est un ADN.

18. Procédé d'amplification selon la
revendication 16, dans lequel l'agglomérat de molécules
30 est un prion.

1 / 2

FIG. 1



2 / 2

FIG. 2

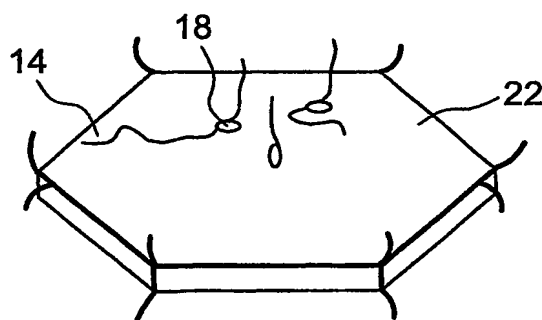


FIG. 3

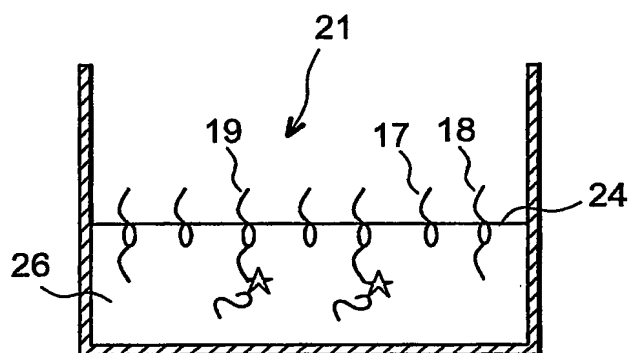


FIG. 4

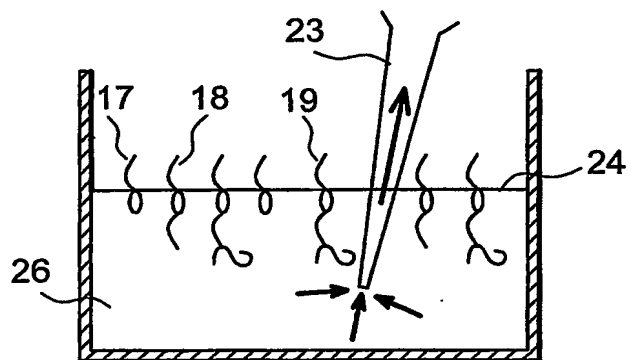
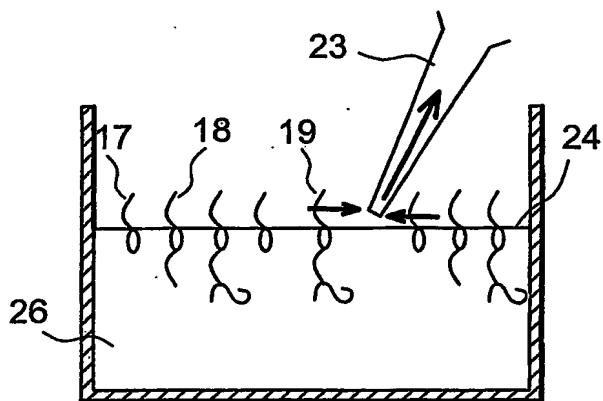


FIG. 5



(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
2 octobre 2003 (02.10.2003)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2003/080209 A3

(51) Classification internationale des brevets⁷ : C12Q 1/68,
C07K 1/14, G01N 1/28, B01D 15/00, G01N 1/34

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2003/000920

(22) Date de dépôt international : 24 mars 2003 (24.03.2003)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
02/3690 25 mars 2002 (25.03.2002) FR

(71) Déposants (pour tous les États désignés sauf US) : COM-
MISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE [FR/FR];
31/33, rue de la Fédération, F-75752 PARIS 15ème (FR).
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE [FR/FR]; 3 rue Michel Ange, F-75794 PARIS
CEDEX 16 (FR).

(72) Inventeurs; et

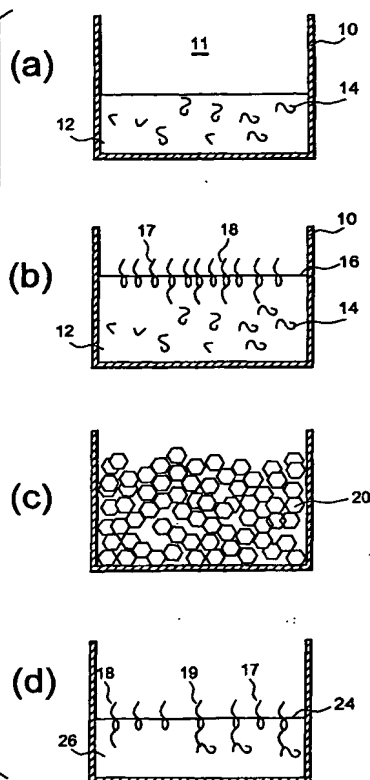
(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) :
BERTHIER, Jean [FR/FR]; 8 rue des Florentines,
F-38240 MEYLAN (FR). DAVOUST, Laurent [FR/FR];
40 rue Claude Genin, F-38100 GRENOBLE (FR).

(74) Mandataire : GUERRE, Fablen; c/o BREVATOME, 3,
rue du Docteur Lancereaux, F-75008 PARIS (FR).

[Suite sur la page suivante]

(54) Title: METHOD OF CONCENTRATING MACROMOLECULES OR AGGLOMERATES OF MOLECULES OR PARTICLES

(54) Titre : PROCEDE DE CONCENTRATION DE MACROMOLECULES OU AGGLOMERATS DE MOLECULES OU DE PARTICULES



(57) Abstract: The invention relates to a method for the selective concentration of a macromolecule or an agglomerate of molecules or particles contained in a liquid sample. The inventive method comprises the following steps, namely: the formation of a foam -or emulsion-type stabilised dispersion from a medium comprising the aforementioned liquid sample and an interfacial layer, whereby said interfacial layer can selectively fix the macromolecule or the agglomerate to be concentrated; and the resorption of the dispersion formed during the preceding step so as to reform said interfacial layer. The invention can be used to concentrate DNA, proteins, prions, colloidal particles.

(57) Abrégé : La présente invention a pour objet un procédé de concentration sélective d'une macromolécule ou d'un agglomérat de molécules ou particules contenu dans un échantillon liquide, comprenant successivement les étapes suivantes : - formation d'une dispersion stabilisée de type mousse ou émulsion, à partir d'un milieu comprenant ledit échantillon liquide et une couche interfaciale, ladite couche interfaciale étant apte à fixer sélectivement ladite macromolécule ou ledit agglomérat à concentrer ; et- résorption de la dispersion formée lors de l'étape précédente de façon à reformer ladite couche interfaciale. Application à la concentration d'ADN, de protéines, de prions, de particules colloïdales.

WO 2003/080209 A3



(81) États désignés (*national*) : JP, US.

(84) États désignés (*régional*) : brevet européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR).

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale

(88) Date de publication du rapport de recherche internationale:

1 avril 2004

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
FR 03/00920

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12Q1/68 C07K1/14 G01N1/28 B01D15/00 G01N1/34

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12Q C07K G01N B01D C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

WPI Data, EPO-Internal, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 6 020 131 A (K. IJIRO) 1 February 2000 (2000-02-01) column 2, line 14 - line 23 column 4, line 16 - line 26; figure 2 ---	1,4,5,9, 15
A	EP 0 245 985 A (ROHM AND HAAS COMPANY) 19 November 1987 (1987-11-19) claims 1,6 ---	1,2,6
A	US 5 024 952 A (G.M. ALSOP) 18 June 1991 (1991-06-18) column 5, line 10 -column 12, line 28 ---	1
A	WO 97 34909 A (BIOMÉRIEUX) 25 September 1997 (1997-09-25) claim 1 ---	1,9
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

29 September 2003

Date of mailing of the international search report

07/10/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hilgenga, K

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

FR 03/00920

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 015, no. 096 (C-0812), 7 March 1991 (1991-03-07) & JP 02 307571 A (FUJI PHOTO FILM CO LTD), 20 December 1990 (1990-12-20) abstract</p> <p>-----</p>	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

EP 03/00920

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 6020131	A	01-02-2000	JP 3241580 B2	25-12-2001
			JP 8313521 A	29-11-1996
			US 5871915 A	16-02-1999
EP 245985	A	19-11-1987	AT 64687 T	15-07-1991
			CA 1315228 C	30-03-1993
			DE 3770992 D1	01-08-1991
			DK 214387 A	29-10-1987
			EP 0245985 A2	19-11-1987
			FI 871832 A	29-10-1987
			NO 871732 A ,B,	29-10-1987
			US 5110733 A	05-05-1992
			JP 1119311 A	11-05-1989
			JP 2019723 C	19-02-1996
			JP 7041124 B	10-05-1995
			KR 9202452 B1	24-03-1992
US 5024952	A	18-06-1991	CA 2035473 A1	27-12-1990
			EP 0431157 A1	12-06-1991
			JP 4500410 T	23-01-1992
			WO 9100508 A1	10-01-1991
WO 9734909	A	25-09-1997	AT 231875 T	15-02-2003
			CA 2222192 A1	25-09-1997
			DE 69718752 D1	06-03-2003
			EP 0842184 A1	20-05-1998
			ES 2188926 T3	01-07-2003
			WO 9734909 A1	25-09-1997
			JP 11505426 T	21-05-1999
JP 02307571	A	20-12-1990	NONE	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No
FR 03/00920

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 C12Q1/68 C07K1/14

G01N1/28

B01D15/00

G01N1/34

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C12Q C07K G01N B01D C12N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

WPI Data, EPO-Internal, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	US 6 020 131 A (K. IJIRO) 1 février 2000 (2000-02-01) colonne 2, ligne 14 - ligne 23 colonne 4, ligne 16 - ligne 26; figure 2 ---	1,4,5,9, 15
A	EP 0 245 985 A (ROHM AND HAAS COMPANY) 19 novembre 1987 (1987-11-19) revendications 1,6 ---	1,2,6
A	US 5 024 952 A (G.M. ALSOP) 18 juin 1991 (1991-06-18) colonne 5, ligne 10 -colonne 12, ligne 28 ---	1
A	WO 97 34909 A (BIOMÉRIEUX) 25 septembre 1997 (1997-09-25) revendication 1 ---	1,9
	-/-	



Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

° Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

29 septembre 2003

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

07/10/2003

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Hilgenga, K

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No
PCT/FR 03/00920

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 015, no. 096 (C-0812), 7 mars 1991 (1991-03-07) & JP 02 307571 A (FUJI PHOTO FILM CO LTD), 20 décembre 1990 (1990-12-20) abrégé</p> <p>-----</p>	1

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux familles de brevets

Demande Internationale No

FR 03/00920

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 6020131	A	01-02-2000	JP 3241580 B2 JP 8313521 A US 5871915 A	25-12-2001 29-11-1996 16-02-1999
EP 245985	A	19-11-1987	AT 64687 T CA 1315228 C DE 3770992 D1 DK 214387 A EP 0245985 A2 FI 871832 A NO 871732 A ,B, US 5110733 A JP 1119311 A JP 2019723 C JP 7041124 B KR 9202452 B1	15-07-1991 30-03-1993 01-08-1991 29-10-1987 19-11-1987 29-10-1987 29-10-1987 05-05-1992 11-05-1989 19-02-1996 10-05-1995 24-03-1992
US 5024952	A	18-06-1991	CA 2035473 A1 EP 0431157 A1 JP 4500410 T WO 9100508 A1	27-12-1990 12-06-1991 23-01-1992 10-01-1991
WO 9734909	A	25-09-1997	AT 231875 T CA 2222192 A1 DE 69718752 D1 EP 0842184 A1 ES 2188926 T3 WO 9734909 A1 JP 11505426 T	15-02-2003 25-09-1997 06-03-2003 20-05-1998 01-07-2003 25-09-1997 21-05-1999
JP 02307571	A	20-12-1990	AUCUN	